

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-347107
(P2002-347107A)

(43) 公開日 平成14年12月4日 (2002.12.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
B 2 9 C 55/02		B 2 9 C 55/02	4 B 0 2 9
C 1 2 M 3/00		C 1 2 M 3/00	A 4 B 0 6 5
// C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E 4 F 2 1 0

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2001-152364(P2001-152364)

(22) 出願日 平成13年5月22日 (2001.5.22)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 下村 政嗣

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72) 発明者 西川 雄大

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス (外3
名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材

(57) 【要約】

【課題】 細胞の培養や、細胞から3次元組織体の形成のために利用可能な延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材を提供すること。

【解決手段】 生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は複数のポリマーの混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られる延伸フィルム。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られる延伸フィルム。

【請求項2】 生分解性ポリマーとして脂肪族ポリエステルを使用する、請求項1に記載の延伸フィルム。

【請求項3】 生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物として、50～99w/w%の生分解性ポリマーおよび50～1w/w%の両親媒性ポリマーからなるポリマー混合物を使用する、請求項1又は2に記載の延伸フィルム。

【請求項4】 疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、高湿度空気を吹き付けることで該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られる、請求項1から3の何れかに記載の延伸フィルム。

【請求項5】 疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50～95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られる、請求項1から4の何れかに記載の延伸フィルム。

【請求項6】 延伸を一軸延伸、二軸延伸又は三軸延伸によって行う、請求項1から5の何れかに記載の延伸フィルム。

【請求項7】 延伸方向の伸長率が1.1から10倍の範囲内である、請求項1から6の何れかに記載の延伸フィルム。

【請求項8】 前記ハニカム構造体の直径が0.1～100 μ mである、請求項1から7の何れかに記載の延伸フィルム。

【請求項9】 請求項1から8の何れかに記載の延伸フィルムからなる細胞培養用基材。

【請求項10】 請求項1から8の何れかに記載の延伸フィルム又は請求項9に記載の細胞培養用基材を用いて、細胞を培養する方法。

【請求項11】 (1) 生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は複数のポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることによりハニカム構造体を延伸する工程；及び(2) 上記のハニカム構造体を延伸する工程：を含む、請求項1に記載の延伸フィルムの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材に関するものである。より詳細には、本発明は、医療やバイオテクノロジーで近年研究が盛んな細胞工学や組織工学に应用可能な延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材に関するものである。より具体的には、細胞の培養や、細胞から3次元組織体の形成のために利用可能な延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材に関するものである。

【0002】

【従来の技術】細胞と材料との相互作用において、細胞は材料表面の化学的な性質のみならず微細な形状によっても影響を受けることが知られている。そこで組織工学などの観点から細胞の機能制御を目指すとき、細胞と接触する材料表面の化学的性質と微細な構造の双方の加工が重要となる。表面の微細加工法としては、表面加工技術として半導体産業等に利用されているマイクロパターン技術を利用した細胞接着面のサイズコントロール、培養基板への微小溝構造の導入、マイクロスフィアによる微細凹凸の作製などが挙げられ、表面微細構造が細胞の成長等に大きく影響を及ぼすことが知られている。

【0003】これらのマイクロパターン技術を使った表面設定は、非常に高度な技術が必要であり、大量生産が出来ない、高コストになる、などの多くの問題を抱えているのが現状である。全く別の表面パターンニング技術としては特殊な構造を有するポリマーの希薄溶液を高湿度下でキャストすることで μ mスケールのハニカム構造を有するフィルムが得られることが知られている。本方法はパターンニングするに当たっての経済性に優れることが特徴である。

【0004】具体的には、サイエンス、1999年、283巻、ページ373には親水性ブロックと疎水性のブロックからなるロッド-コイルジブロックポリマーであるポリフェニルキノリン-ブロック-ポリスチレンを使う例が、また、ネイチャー、1994年、369巻、ページ387にはポリスチレンと剛直なブロックであるポリパラフェニレンとからなるジブロックポリマーを使った例が開示されている。このように、従来の技術では自己凝集力の強い部分と柔軟性を発現する部分とを併せ持つ特殊なポリマーを利用し、これらのポリマーを疎水性有機溶媒に溶解し、これをキャストする事でハニカム構造体を調製していた。一方、本発明者らはシンソリッド フィルムズ、1998年、327-329巻、ページ854、スーパーモレキュラーサイエンス、1998年、第5巻、ページ331、及びモレキュラー・クリスタル・リキッド・クリスタル、1998年、第322巻、ページ305に親水性のアクリルアミドポリマーを主鎖骨格とし、疎水性側鎖としてドデシル基と親水性側鎖としてラクトース基或いはカルボキシル基を併せ持つ両親媒性ポリマー、或いはヘパリンやデキストラン硫酸などのアニオン性多糖と4級の長鎖アルキルアンモニ

ウム塩とのイオンコンプレックスが同様な方法でハニカム構造を有する薄膜を与えることを報告している。

【0005】しかしながらこれらのポリマーでは、得られるハニカム構造体の自己自立性に劣ったり、経時的にハニカム構造が崩壊するなどの欠点を有するため、細胞培養用基材として十分な機能を提供するものでなかった。

【0006】細胞工学、組織工学等において細胞培養を行う時、細胞の足場となる基材が必要であり、前述の如く、細胞との相互作用において細胞は最良表面の化学的な性質のみならず微細な形状によっても影響を受けることが知られている。細胞の機能制御を目指すとき、細胞と接触する材料表面の化学的性質と細胞の微細な構造の双方の設計が重要となる。ハニカム構造を有する多孔性フィルムではハニカムパターンが細胞接着面を提供し、多孔質構造が細胞の支持基盤へのアクセス、栄養の供給ルートとなることが示されている。

【0007】このハニカム構造フィルムをベースに細胞を組織化すれば、その1つの利用方法として人工臓器が考えられる。しかし人工臓器等にしたときには体内に埋め込むことが必須となる為、この基材は長期的には生体内へ吸収されることが望ましい。これまでのハニカム構造を与える材料で細胞培養に要する時間は安定に構造を維持し、それ以上では分解するような生分解性材料から作られたものはない。言い換えれば、ハニカム構造体と細胞工学、細胞培養技術を組み合わせ人工臓器等の医療用途へ展開するに当たっては生分解性材料を使うことが必須である。

【0008】このような事情に鑑み、本発明者らは、生分解性ポリマーが50～99w/w%および両親媒性ポリマーが50～1w/w%からなるポリマーの疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50～95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を徐々に蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることで得られるハニカム構造体、並びに該ハニカム構造体からなるフィルムを提案している（特願平11-340568号明細書（本出願時点において未公開））。しかしながら、この方法で作製したハニカム構造を有するフィルムの細孔の配列は等方的であり、この上で細胞の配列を制御することは困難であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、細胞の培養や、細胞から3次元組織体の形成のために利用可能な延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、細胞の配列を制御することが可能な延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材を提供することを解決すべき課題とした。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、生分解性と両親媒性を併有する弾性ポリマーのハニカム構造体を延伸したところ、該延伸により等方的な配列だったハニカム多孔構造が、異方性を示す細孔の配列に変化することを見出した。さらに、この延伸フィルム上で心筋細胞の培養を行った結果、細孔の直線的な配列に沿って細胞を配向させることができることを実証した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0011】即ち、本発明によれば、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られる延伸フィルムが提供される。

【0012】本発明において好ましくは、生分解性ポリマーとして脂肪族ポリエステルを使用する。本発明において好ましくは、生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物として、50～99w/w%の生分解性ポリマーおよび50～1w/w%の両親媒性ポリマーからなるポリマー混合物を使用する。

【0013】本発明の延伸フィルムは、例えば、疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、高湿度空気を吹き付けることで該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られるか、あるいは、疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50～95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られる。

【0014】本発明において好ましくは、延伸は一軸延伸、二軸延伸又は三軸延伸によって行うことができ、延伸方向の伸長率は1.1から10倍の範囲内であり、また、ハニカム構造体の直径は0.1～100μmである。

【0015】本発明の別の側面によれば、上記した本発明の延伸フィルムからなる細胞培養用基材が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の延伸フィルム又は細胞培養用基材を用いて、細胞を培養する方法が提供される。

【0016】本発明のさらに別の側面によれば、(1)生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は複数のポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることによりハニカム構造体を延伸する工程；及び

(2) 上記のハニカム構造体を延伸する工程：を含む、本発明の延伸フィルムの製造方法が提供される。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。本発明の延伸フィルムは、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体を延伸することによって得られることを特徴とする。

【0018】本発明では、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマーを使用してもよいし、あるいは、生分解性を有するポリマーと両親媒性を有するポリマーから成る複数のポリマーの混合物を使用してもよい。

【0019】本発明で用いることができる生分解性ポリマーとしては、ポリ乳酸、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリエチレンアジペート、ポリブチレンアジペートなどの生分解性脂肪族ポリエステル、並びにポリブチレンカーボネート、ポリエチレンカーボネート等の脂肪族ポリカーボネート等が、有機溶媒への溶解性の観点から好ましい。中でも、ポリ乳酸、ポリカプロラクトンが入手の容易さ、価格等の観点から望ましい。

【0020】本発明で用いることができる両親媒性ポリマーとしては、細胞培養基材として利用することを考慮すると毒性のないことが好ましく、ポリエチレングリコール/ポリプロピレングリコールブロック共重合体、アクリルアミドポリマーを主鎖骨格とし、疎水性側鎖としてドデシル基と親水性側鎖としてラクトース基或いはカルボキシル基を併せ持つ両親媒性ポリマー、或いはヘパリンやデキストラン硫酸、核酸(DNAやRNA)などのアニオン性高分子と長鎖アルキルアンモニウム塩とのイオンコンプレックス、ゼラチン、コラーゲン、アルブミン等の水溶性タンパク質を親水性基とした両親媒性ポリマー等を利用することが望ましい。

【0021】また、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマーとしては、例えば、ポリ乳酸-ポリエチレングリコールブロック共重合体、ポリエーカプロラクトン-ポリエチレングリコールブロック共重合体、ポリリンゴ酸-ポリリンゴ酸アルキルエステルブロック共重合体などが挙げられる。

【0022】本発明のハニカム構造体を作成するに当たってはポリマー溶液上に微小な水滴粒子を形成させることが必要であることから、使用する有機溶媒としては非水溶性(疎水性)であることが必要である。疎水性有機溶媒の例としてはクロロホルム、塩化メチレン等のハロゲン系有機溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル類、メチルイソブチルケトンなどの非水溶性ケトン類、

二硫化炭素などが挙げられる。これらの有機溶媒は単独で使用しても、又、これらの溶媒を組み合わせた混合溶媒として使用してもよい。疎水性有機溶媒に溶解する生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーの両者の合計のポリマー濃度は、好ましくは0.01から10重量%であり、より好ましくは0.05から5重量%である。ポリマー濃度が0.01重量%より低いと得られるフィルムの力学強度が不足し望ましくない。また、ポリマー濃度が10重量%以上ではポリマー濃度が高くなりすぎ、十分なハニカム構造が得られない。

【0023】また、生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーを使用する場合、その組成比は特に限定されないが、好ましくは99:1~50:50(wt/wt)の範囲内である。両親媒性ポリマー比が1以下の場合には、均一なハニカム構造が得るのが困難となる場合があり、又、両親媒性ポリマー比が50以上では得られるハニカム構造体の安定性、特に力学的な安定性が低下する場合がある。

【0024】本発明においては該ポリマー有機溶媒溶液を基板上にキャストしハニカム構造体を調製する。基板としてはガラス、金属、シリコンウェハー等の無機材料、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエーテルケトン等の耐有機溶剤性に優れた高分子、水、流動パラフィン、液状ポリエーテル等の液体が使用できる。中でも、基材に水を使用した場合、該ハニカム構造体の特徴である自立性を生かすことで、該構造体を単独で容易に基板から取り出すことができ、好適である。

【0025】本発明で、ハニカム構造が形成される機構は次のように考えられる。疎水性有機溶媒が蒸発するとき、潜熱を奪う為に、キャストフィルム表面の温度が下がり、微小な水の液滴がポリマー溶液表面に凝集、付着する。ポリマー溶液中の親水性部分の働きによって水と疎水性有機溶媒の間の表面張力が減少し、このため、水微粒子が凝集して1つの塊になろうとするに際し、安定化される。溶媒が蒸発していくに伴い、ヘキサゴナルの形をした液滴が最密充填した形で並んでいき、最後に、水が飛び、ポリマーが規則正しくハニカム状に並んだ形として残る。

【0026】従って、該フィルムを調製する環境としては、(1)疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、高湿度空気を吹き付けることで該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させる方法；並びに(2)疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50~95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させる方法；などが好ましい。このようにしてできるハニカム構造体のひとつひとつ(個々)の大きさは、特に限定されないが、好ましくは0.1から100 μ mであり、より好ましくは0.1から10 μ mであり、この

範囲の大きさであれば、細胞培養用の基材として好適に用いることができる。

【0027】本発明の延伸フィルムは、上記のようにして得られるハニカム構造体を延伸することによって得られる。延伸の方法は、特に限定されず、例えば、ハニカム構造体フィルムの2以上の端をピンセット又は手でつまみ、伸長方向に引っ張ることにより行うことができる。あるいは、マイクロマニピュレーターを用いて延伸を行うこともできる。

【0028】本発明において、延伸は、一軸延伸、二軸延伸又は三軸延伸の何れでもよい。本発明における延伸の具体例の模式図を図1に示す。図1において、(a)は一軸延伸、(b)は二軸延伸、(c)は三軸延伸を示し、 α は対称軸と延伸方向のなす角を示し、 β 及び γ は延伸方向のなす角を示す。本発明において、延伸方向の伸長率は特に限定されないが、好ましくは1.1から10倍の範囲内である。伸長率が1.1倍以下では延伸による本発明の効果が小さく、また伸長率が10倍以上ではフィルムが破壊され易くなる。

【0029】上記のようにして作製した本発明の延伸フィルムは、細胞培養用基材として用いることができ、該基材を用いて細胞を培養することができる。本発明の延伸フィルムを用いて培養できる細胞の種類は特に限定されず、任意の培養細胞、並びに組織から採取した細胞などを培養することができる。

【0030】細胞培養に用いる培地の種類は特に限定されず、細胞の種類に応じて適当な培地（例えば、Williams' E培地、F-10培地、RPM11640培地、EagleのMEM培地、DMEM培地、またはこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等）を選択することができる。培養条件は細胞の種類に応じて適宜選択することができ、一般的にはpH6～8、温度30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で培養を行うことができる。

【0031】本発明の細胞培養用基材を用いて、例えば、細胞から3次元組織体を形成することもできる。また、本発明の細胞培養用基材は、特に細胞の配列を制御することが可能であり、特に、心筋組織や血管組織などのように細胞の配列構造を有する組織の再生に利用可能である。以下、本発明を実施例を使って詳細に説明するが、本発明は実施例によって何ら限定されるものではない。

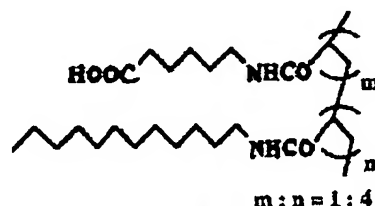
【0032】

【実施例】実施例1：ポリε-カプロラクトン（分子量：100,000～190,000）のクロロホルム溶液（10g/L）、両親媒性高分子Cap（化学構造は以下に記載）のベンゼン溶液（0.4g/L）、ベンゼンを1：2.5：6.5の割合（体積比）で混合し、ポリマー溶液を調製した。直径9cmのガラスシャーレにMilli-Q水を張り、この水面上にポリマー溶液90μLを一様に展開し液滴が広がる状態にした。溶媒が蒸発したのを確

認した後、同じ溶液150μLを水面上にキャストし、高湿度空気を吹き付けることでハニカムフィルム（直径：2cm）を得た（図2）。水面上に浮いているハニカムフィルムの両端をピンセットでつまみ、一軸方向に延伸し、長軸：3.4cm、短軸：1.8cmの延伸フィルムを得た。これをガラス板上に移した。延伸フィルムの光学顕微鏡写真（図2）に、伸長した細孔の配列構造が認められた。

【0033】

【化1】



Capの構造式

【0034】試験例1：実施例1で得られた延伸フィルムをガラス基板上に設置し、この上でラット胎児心臓由来心筋細胞の培養を行った。培養はF10培地を用い、CO₂インキュベーター内（CO₂濃度＝5%、温度＝37℃、相対湿度＝80%）で行った。比較例として未延伸のハニカム構造体フィルムをガラス基板上に設置したもの、細孔のないPCL-両親媒性高分子キャスト膜をガラス基板上に設置したものに心筋細胞を播種し、同様の条件で培養を行った。

【0035】培養後、光学顕微鏡写真をとった結果を図2に示す。図2の結果から分かるように、実施例1で得られた延伸フィルムを用いた場合、細胞は、特定の一方方向に伸展かつ配列しており、その方向はフィルムの延伸方向に一致していた。また、比較例の場合には、心筋細胞の伸展および配列方向に規則性は認められなかった。

【0036】

【発明の効果】本発明により、細胞の培養や、細胞から3次元組織体の形成のために利用可能な延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材、特に細胞の配列を制御することが可能な延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材を提供することが可能になった。本発明の延伸フィルムおよびそれを用いた細胞培養基材は、特に、心筋組織や血管組織などのように細胞の配列構造を有する組織の再生に利用可能であり、広範な細胞及び／又は組織の培養・再生に応用可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ハニカム構造体の延伸の様式を示す図である。

【図2】図2は、ポリε-カプロラクトンハニカム構造体（左上）およびその延伸構造体（左下）の光学顕微鏡写真、並びに、これらの構造体の上で培養した心筋細胞の蛍光顕微鏡写真（右上：ポリε-カプロラクトンハニカム構造体、及び、右下：ポリε-カプロラクトンハニ

カム構造体の延伸フィルム)を示す。

【図1】

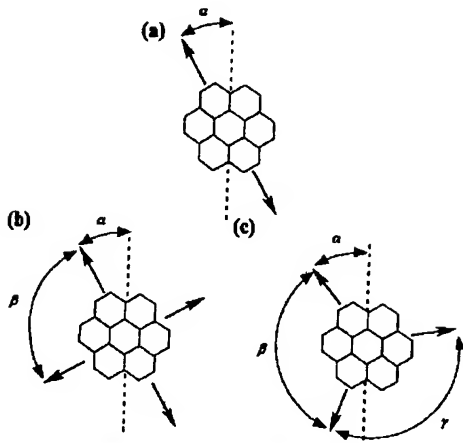


図1 ヘニカム構造体の延伸の様式。(a)一軸延伸、(b)二軸延伸、(c)三軸延伸。
 α は対称軸と延伸方向のなす角。 β 、 γ は延伸方向のなす角。

【図2】

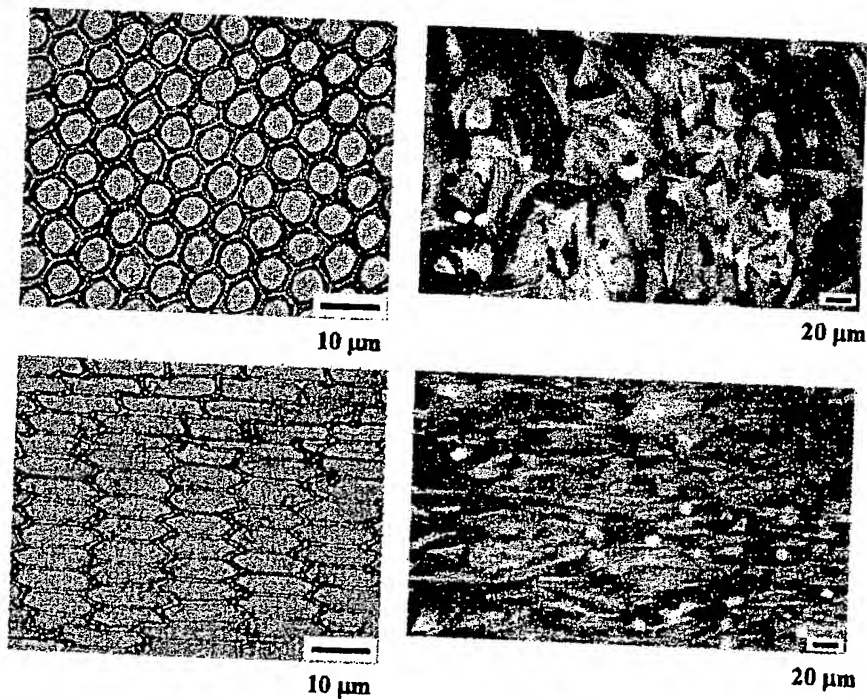


図2 ポリ-ε-カプロラクトンヘニカム構造体 (左上) および、その延伸構造体 (左下) の
光学顕微鏡写真。これら構造体上で培養した心筋細胞の蛍光顕微鏡写真
(右上: ポリ-ε-カプロラクトン構造体ヘニカムフィルム上、右下: 延伸構造体フィルム上)。

フロントページの続き

(72)発明者 新井 景子

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

Fターム(参考) 4B029 AA08 BB11 CC02 CC08 GA03

GB09

4B065 AA90X BC41 CA44

4F210 AA24 AG01 QA02 QC01 QC05

QC09 QD19 QG01 QG08 QG18

THIS PAGE BLANK (USPTO)